

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

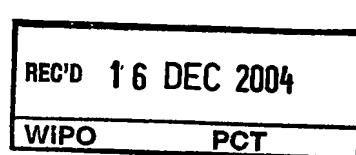
28.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日      2003年10月28日  
Date of Application:

出願番号      特願2003-366798  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [JP2003-366798]



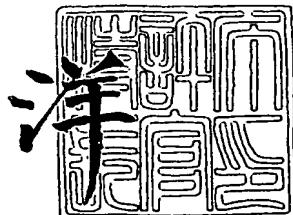
出願人      日本澱粉工業株式会社  
Applicant(s):      丸山 征郎

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

八 月



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03NDK0002  
【提出日】 平成15年10月28日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 A61K 31/70  
【発明者】  
【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘6丁目45-10  
【氏名】 丸山 征郎  
【発明者】  
【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市宇宿町2550 サニーホームズMK202  
【氏名】 阿邊山 和浩  
【発明者】  
【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市南栄3-20 日本澱粉工業株式会社 内  
【氏名】 吉元 寧  
【特許出願人】  
【識別番号】 390015004  
【氏名又は名称】 日本澱粉工業株式会社  
【特許出願人】  
【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘6丁目45-10  
【氏名又は名称】 丸山 征郎  
【代理人】  
【識別番号】 100080609  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 大島 正孝  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 006954  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【物件名】 図面 1  
【包括委任状番号】 0017600

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

1,5-D-アンドロフルクトースおよび/またはアスコピロンPを含有することを特徴とする腫瘍の増殖ないし転移抑制剤。

【請求項2】

1,5-D-アンドロフルクトースおよび/またはアスコピロンPの、腫瘍の増殖ないし転移の抑制のための使用。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】1, 5-D-アントラクトースおよび/またはアスコピロンPを含有する腫瘍の増殖または転移抑制剤

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、1, 5-D-アントラクトースおよび/またはアスコピロンPの腫瘍の増殖ないし転移抑制剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

1, 5-D-アントラクトースは、子囊菌などの微生物あるいは紅藻などの組織に存在する酵素 $\alpha$ -1, 4-グルカンリーゼの作用により澱粉あるいは澱粉分解物を基質として生産することができる。1, 5-D-アントラクトースは、グルコースから水分子が1つ取れた特異的な構造を有する糖である。既に、これまで抗酸化活性（[特許文献1] 参照）や抗菌活性を有することが報告されている（[特許文献2] 参照）。さらに、最近の研究では高血糖抑制作用（[特許文献3] 参照）、血栓形成防止作用があることも報告されており、生理活性を持つ新規の糖としても注目されている。

## 【0003】

アスコピロンP（2-Hydroxymethyl-5-hydroxy-2, 3-dihydro-4H-pyran-4-one）は1, 5-D-アントラクトースから水が1分子脱離した構造をもつ（図1）。アスコピロンPは、ある種の真菌類により生成されることが知られており（[非特許文献1] 参照）、真菌類のPezizales目（例えば、Picaria leiocarpa および Anthracobia malaloma）ならびにTuberales目（例えば、Tuber melanosporum）の菌体抽出液を1, 5-D-アントラクトースに作用させ調製できることも報告されている。また、アスコピロンPはセルロース等の糖質を加熱処理することも、微量ではあるが生成することが可能である（[非特許文献2] 参照）。

## 【0004】

アスコピロンPはさらに1, 5-D-アントラクトースと同様に抗酸化活性、抗菌活性を有することが報告されている（[特許文献4] および [特許文献5] 参照）。

## 【0005】

現在、臨床の場で使用されている抗腫瘍剤の多くは、化学的性質上、酸化促進作用を有しており、それによる炎症作用により、高度に副作用（肝障害、腎障害、骨髓抑制、肺障害等）を併発する可能性がある。これに対し、1, 5-D-アントラクトースおよびアスコピロンPは抗酸化活性ならびに抗炎症効果をもつことから、従来の抗腫瘍剤に見られるような副作用は少ないと考えられる。また、他の抗腫瘍剤との併用において、抗腫瘍効果の増強が期待できるだけでなく副作用の軽減をもたらす化学療法補助薬への応用も期待できる。

【特許文献1】特表平9-505988号公報

【特許文献2】特表2001-89377号公報

【特許文献3】特表2003-519660号公報

【特許文献4】WO02/26060

【特許文献5】WO02/26061

【非特許文献1】M. A. Baute., phytochemistry, 33, 41-45 (1991)

【非特許文献2】Shafizadeh, F., et al., Carbohydr. Res., 67, 433-447 (1978)

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明の目的は、1, 5-D-アントラクトースおよび/またはアスコピロンP

の腫瘍の増殖ないし転移抑制のための使用を提供することにある。

【0007】

本発明の他の目的は、1, 5-D-アンヒドロフルクトースおよび／またはアスコピロンPを活性成分とする炎症を惹起しない予後に優れた腫瘍の増殖ないし転移抑制剤を提供することにある。

【0008】

本発明のさらに他の目的および利点は、以下の説明から明らかになろう。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、1, 5-D-アンヒドロフルクトースおよび／またはアスコピロンPを含有することを特徴とする、腫瘍の増殖ないし転移抑制によって達成される。

【0010】

すなわち、生体内に腫瘍細胞を保有する個体に本発明の剤を適当量しかるべき方法で投与することにより、有為に腫瘍の増殖ないし転移を抑制することが認められる。本発明の剤は、それ自体公知の種々の投与方法で投与することが可能であるが、好ましくは注射あるいは点滴等の方法で直接体内に、より好ましくは腹腔内に、投与することができる。投与量は、投与方法、腫瘍の種類および重篤度により異なるが、一回の投与量を10～1, 000mg/kgとし、投与回数、頻度は毎日、隔日、数日おき等から選択することが可能である。

【0011】

本発明の剤の形態は、投与方法により異なるが、注射による投与の場合は液状であることが好ましい。本発明の剤の成分としては、1, 5-D-アンヒドロフルクトース、アスコピロンP以外にも種々の安定剤、すなわち、pH安定剤、抗酸化剤等を添加することが可能である。さらに、他の薬理成分および／またはブドウ糖などの栄養成分を添加することも可能である。

【0012】

以下に本発明について検討した結果を詳述する。なお、以下の試験においては1, 5-D-アンヒドロフルクトースおよびアスコピロンPは、高速液体クロマトグラフで分析し、純度99%以上のものを使用した。

【0013】

【試験例】

＜細胞株および培養方法＞

接着系癌細胞株のB16 melanoma (C57 BL/6 マウスマラノーマ細胞株)、A549 (ヒト肺腺癌細胞株)、Hela (ヒトケラチノサイト由来腫瘍様細胞株)、HeLa (ヒト子宮頸部癌細胞株)は10% FCS (ウシ胎児血清)と2%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDMEM培地で、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で培養した。浮遊系腫瘍細胞のTHP-1 (前骨髓性白血病細胞株)は10% FCSと2%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地で、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下で培養した。

【0014】

＜生細胞数の測定方法＞

6ウェルのプレート上に増殖したB16 melanoma細胞を2%グルタルアルデヒドで固定した後、4%クリスタルバイオレットで染色し、その染色性のある細胞を生細胞と判定した。

【0015】

＜細胞死の割合および各細胞周期にある細胞の割合の測定方法＞

細胞培養液を種々の濃度のアスコピロンP溶液 (アスコピロンPをDMSOに溶解したもの)で刺激し、所定の時間培養後、トリプシンを用い細胞を浮遊した状態で回収した。その後、4°Cで30分間70%エタノールで固定した後、最終50μg/mlプロピジウ

ムヨード (P I) 溶液で染色した。30分後、F A C S を用いて、DNA ヒストグラムを作成し、細胞死の割合および細胞周期について調べた。

## 【0016】

## &lt;結果および考察&gt;

## [アスコピロンPによる細胞増殖抑制効果]

5 ( $10^3$ 個/m<sup>1</sup>) の B 1 6 m e l a n o m a 細胞 (C 5 7 B L / 6 マウスマエラノーマ細胞) を 6 ウェルのプレートに播種し、細胞が底面に接着後 (24 hr)，培養液中の最終濃度が 0 ~ 2 0 0  $\mu$ g/m<sup>1</sup> になるようアスコピロンP溶液 (溶媒としてジメチルスルホキシド (D M S O) を使用) を等量ずつ添加した。37°C, 5% C O<sub>2</sub>条件下で一週間培養後、生細胞数を測定した。

## 【0017】

結果を図2に示す。コントロール (D M S Oのみを添加) では、生存している細胞 (図中では、背景より黒色が強く見える) が多く認められたのに対して、アスコピロンPを添加することにより、濃度依存的に生細胞の数は顕著に減少し、2 0 0  $\mu$ g/m<sup>1</sup>においては、生細胞ほとんど認められなかった。これらの結果から、アスコピロンPは腫瘍細胞の増殖抑制能を有すると考えられた。

## 【0018】

## [アスコピロンPによる腫瘍細胞アポトーシス誘導効果]

B 1 6 m e l a n o m a 細胞に対するアスコピロンPの腫瘍細胞増殖抑制効果の機序が、他の抗腫瘍剤においてみられるような殺細胞効果によるものであるかを検討した。本検討項目において、B 1 6 m e l a n o m a 細胞以外に 4 種類のヒト癌細胞株 (T H P - 1 : 前骨髓性白血病、HeLa : 子宮頸癌、A 5 4 9 : 肺胞上皮癌、HaCaT : 皮膚癌モデル細胞) を加えて、アスコピロンPの刺激により誘導される死細胞の割合を調べた。なお、ここでは各癌細胞培養液に対し、アスコピロンPを最終濃度 2 0 0 g/m<sup>1</sup> になるよう添加し、48時間後の死細胞の割合を測定した。結果を表1に示す。

## 【0019】

【表1】

癌細胞	死細胞の割合 (%)
T H P - 1 (前骨髓性白血病細胞)	29
HeLa (ヒト子宮頸部癌細胞)	11
A 5 4 9 (ヒト肺腺癌細胞)	30
HaCaT (ヒトケラチノサイト由来腫瘍様細胞)	38
B 1 6 m e l a n o m a (C 5 7 B L / 6 マウスマエラノーマ細胞)	25

## 【0020】

表1より、アスコピロンPはそれぞれの癌細胞に由来する癌の種類を問わず、幅広いスペクトラムをもった殺細胞効果を示すことがわかる。さらに、HaCaT細胞を用いた実験系において、アスコピロンPを添加後48時間でアポトーシス特異的なDNAの断片化が認められた (図3)。このことから、アスコピロンPによる細胞死はアポトーシスであることが確認された。同じ結果がA 5 4 9細胞を用いた系においても得られた。さらに、B 1 6 m e l a n o m a 細胞を用いた系において、アスコピロンPは 2 5  $\mu$ g/m<sup>1</sup> 以

上の濃度で、48時間以内に細胞死を誘導することが認められた（表2）。

【0021】

25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  はアスコピロンPのLD<sub>50</sub>値（1,500～2,000  $\text{mg}/\text{kg}$ ）の1/60～1/80に相当する濃度であり、アスコピロンPは生体に毒性を示さない範囲内で抗腫瘍効果をもつことが示唆された。

【0022】

【表2】

アスコピロンP 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	死細胞の割合 (%)	
	添加後 24 h	添加後 48 h
0	0	0
0.1	0.2	0.3
1	1.3	0
12.5	2.1	3.1
25	1.7	14.2
50	1.3	29.3
100	5.3	41.0

【0023】

【アスコピロンPの特異的細胞死誘導作用】

H a C a T 細胞は、10% F C S の存在下では腫瘍細胞としての特徴を有しているが、低濃度のF C S 存在下（1%以下）では、正常細胞に近い性格をもつことが知られている。この性質を利用して、アスコピロンPが正常細胞に及ぼす影響を検討した。結果を図4に示す。腫瘍様に増殖しているF C S 10%条件下ではアスコピロンP添加後（最終濃度200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、48時間以内で38%もの細胞死を誘導したのに対し（図4（c））、正常細胞様の特徴をもつF C S 1%では200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアスコピロンP存在下においても、ほとんど死細胞は認められなかった（図4（b））。これより、アスコピロンPは増殖性の高い細胞（腫瘍細胞）に特異的に作用し、増殖の遅い細胞（正常細胞）にはほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

【0024】

一方、F C S 10%で腫瘍様に増殖しているH a C a T 細胞において、アスコピロンP添加後（最終濃度200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）24時間では、顕著なS期細胞集団の増加およびG<sub>2</sub>/M期の細胞集団の減少が観察され（図5（a））、その後、48時間では先に示したように38%の細胞死を誘導した（図5（b））。このことから、アスコピロンPの細胞周期上の作用点はD N A合成期間であるS期であり、G<sub>2</sub>/M期への移行を阻害し、結果として細胞死を誘導することが示唆される。したがって、アスコピロンPが抗腫瘍剤として生体に投与された場合、大半が細胞周期上のG<sub>0</sub>/1期にあると考えられる正常細胞に障害を与えることなく、腫瘍細胞にのみ特異的に殺細胞効果を発揮することが期待される。

【0025】

以上、i n v i t r o でのアスコピロンPの抗腫瘍効果について実施した試験結果を記載した。一方、1,5-D-アントヒドロフルクトースについては2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でも腫瘍細胞に対して全く死滅効果は認められなかったが、アスコピロンPと構造が近いことからi n v i v o においては抗腫瘍効果をもつ可能性が期待された。

【実施例】

【0026】

以下、実施例により本発明をさらに詳述する。本発明はかかる実施例により何ら制限されるものではない。

## 【0027】

## 実施例1

C57 BL/6 マウスにB16 melanoma細胞 ( $5 \times 10^3$ 個) を腹腔内に播種した後、15日目から毎日PBSならびにアスコピロンP溶液を腹腔内投与し(投与量は200mg/kg)、生存率を調べた(癌性腹膜炎モデル)。この実験系において、予めB16 melanoma細胞をマウスの腹腔内に播種すると、無投与ならびにPBS投与の場合、14日目以降から個体(マウス)は死亡することが確認された。本実験系を用いて、アスコピロンPの末期癌モデルに対する延命効果について検討した結果を図6に示す。平均生存日数はアスコピロンP投与群では8日、PBS群は4日であり、生体内においても抗腫瘍効果を有することが証明された。さらに、アスコピロンP投与群の40% (n=2)において、コントロール(PBS群)と比較して3倍以上ものアスコピロンP投与後の生存期間の延長がみられた。このことは、アスコピロンPのin vivoにおける抗腫瘍効果を意味するものである。

## 【0028】

## 実施例2

実施例1と同様にC57 BL/6 マウスにB16 melanoma細胞 ( $5 \times 10^3$ 個) を腹腔内に播種した後、2日目から毎日PBSならびに1,5-D-アンヒドロフルクトースを腹腔内投与した(投与量は200mg/kg)。生存率を図7に示す。腫瘍細胞播種後の平均生存日数は1,5-D-アンヒドロフルクトース群が19日、コントロールのPBS群が14日であった。この結果から、1,5-D-アンヒドロフルクトースは抗腫瘍効果をもつだけでなく、腫瘍の予防にも役立つものと思われる。

## 【0029】

## 実施例3

C57 BL/6 マウスにB16 melanoma細胞 ( $6 \times 10^3$ 個) を大腿部に皮下播種した後、腫瘍の大きさを測定した。ここで、コントロールのマウスは腫瘍細胞を播種後、通常の飼育を継続し、アスコピロンP投与マウスは播種後、10日目から、12日目、14日目にそれぞれ200mg/kgの割合でアスコピロンPを腹腔内に投与した。結果を図8に示す。アスコピロンP投与マウスでは明らかな腫瘍の肥大化の抑制が観察された。また、コントロール群は16日目以降脱落症例(死亡)が生じ、剖検では肝臓をはじめ3ヶ所に明らかに腫瘍の転移が認められた。一方、アスコピロンP投与群は16日目以降も生存しており、屠殺後の解剖所見では腫瘍の転移はほとんど観察されなかった。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0030】

【図1】アスコピロンPの構造式

【図2】クリスタルバイオレット染色法による、アスコピロンPの細胞増殖抑制能評価

【図3】アガロースゲル電気泳動法によるDNA断片化解析

【図4】フローサイトメトリー(FACS)による死細胞の定量的評価

【図5】フローサイトメトリー(FACS)による死細胞の定量的評価

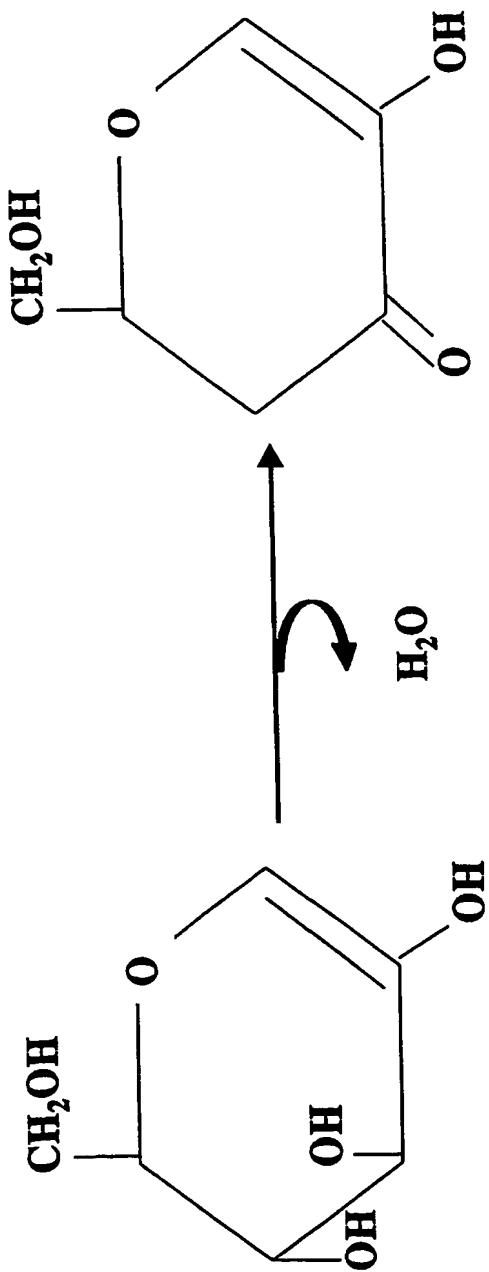
【図6】アスコピロンP投与後のマウスの生存率

【図7】1,5-D-アンヒドロフルクトース投与後のマウスの生存率

【図8】アスコピロンP投与後マウスの腫瘍径の評価

【書類名】 図面  
【図1】

図1



アスコピロンP  
(2-Hydroxymethyl-5-hydroxy  
-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one)

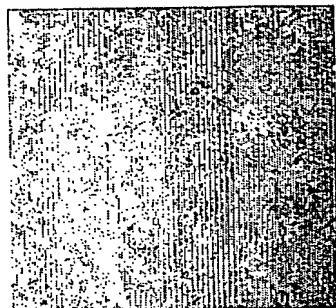
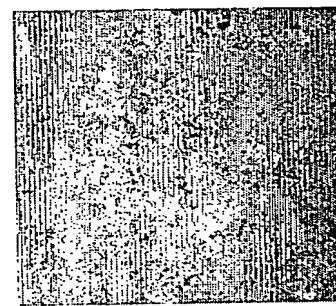
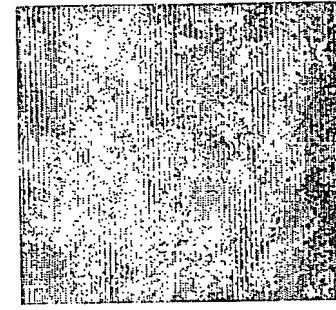
1, 5-D-α,β-dihydrofuran-4-one

【図2】

図2

BEST AVAILABLE COPY

Cell line: B16 melanoma

10  $\mu\text{g/ml}$ 200  $\mu\text{g/ml}$ APP 1  $\mu\text{g/ml}$ 100  $\mu\text{g/ml}$ 

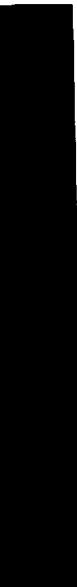
Control

50  $\mu\text{g/ml}$

【図3】

図3

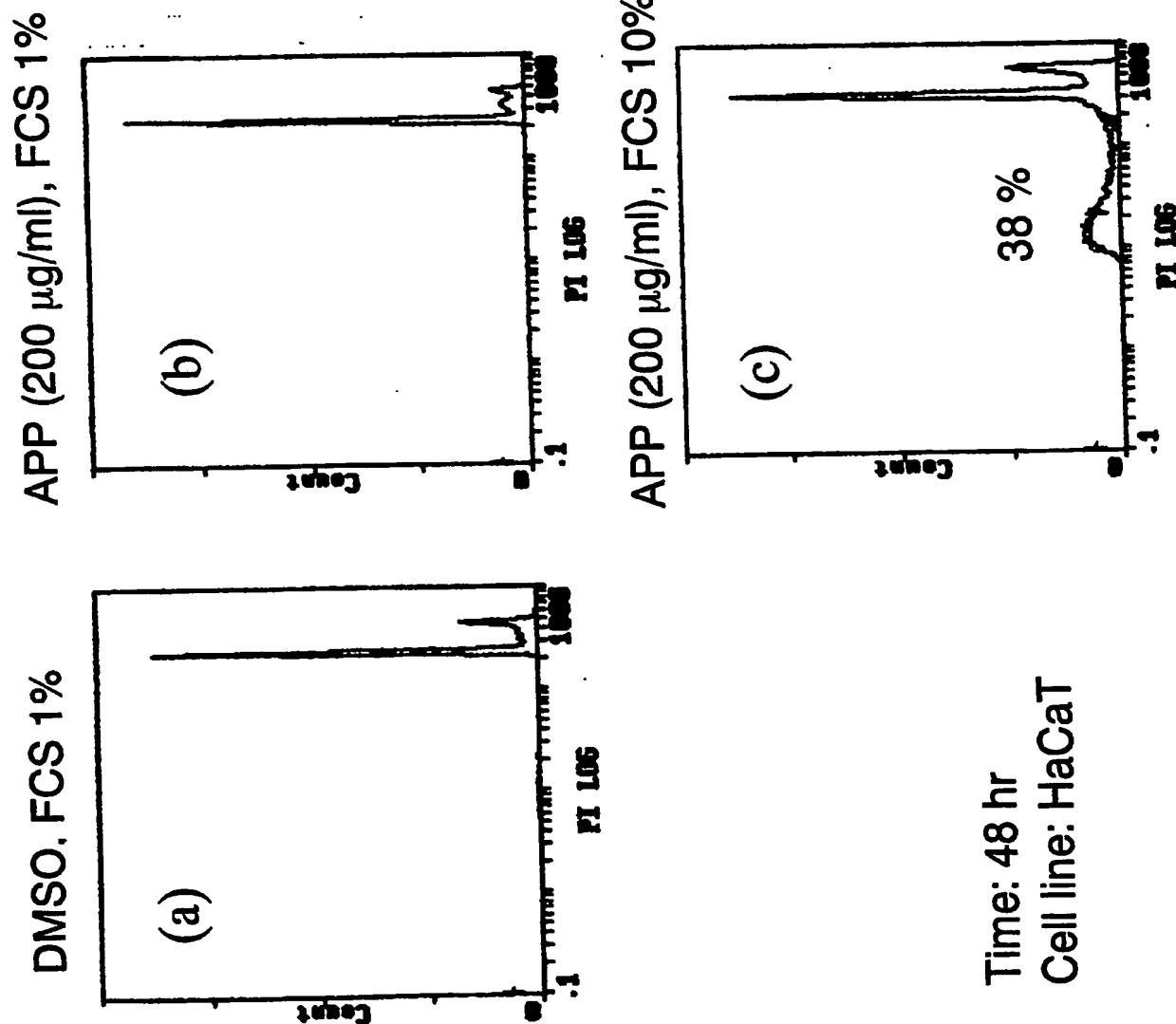
Condition  
Cell line: HaCat  
Time : 48 hr



Condition (DMSO)  
APP (200 ng/ml)

【図4】

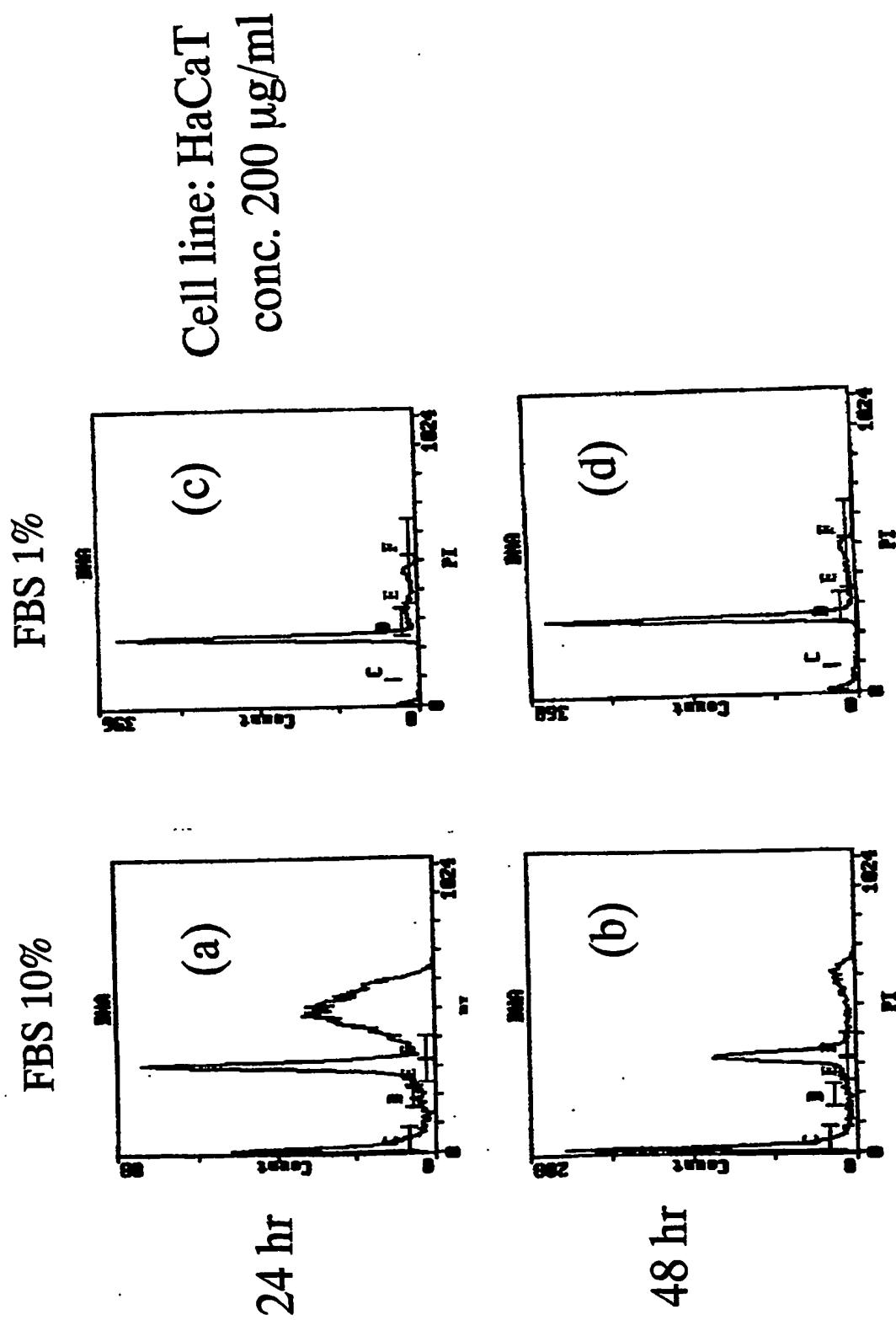
図4



Time: 48 hr  
 Cell line: HaCaT

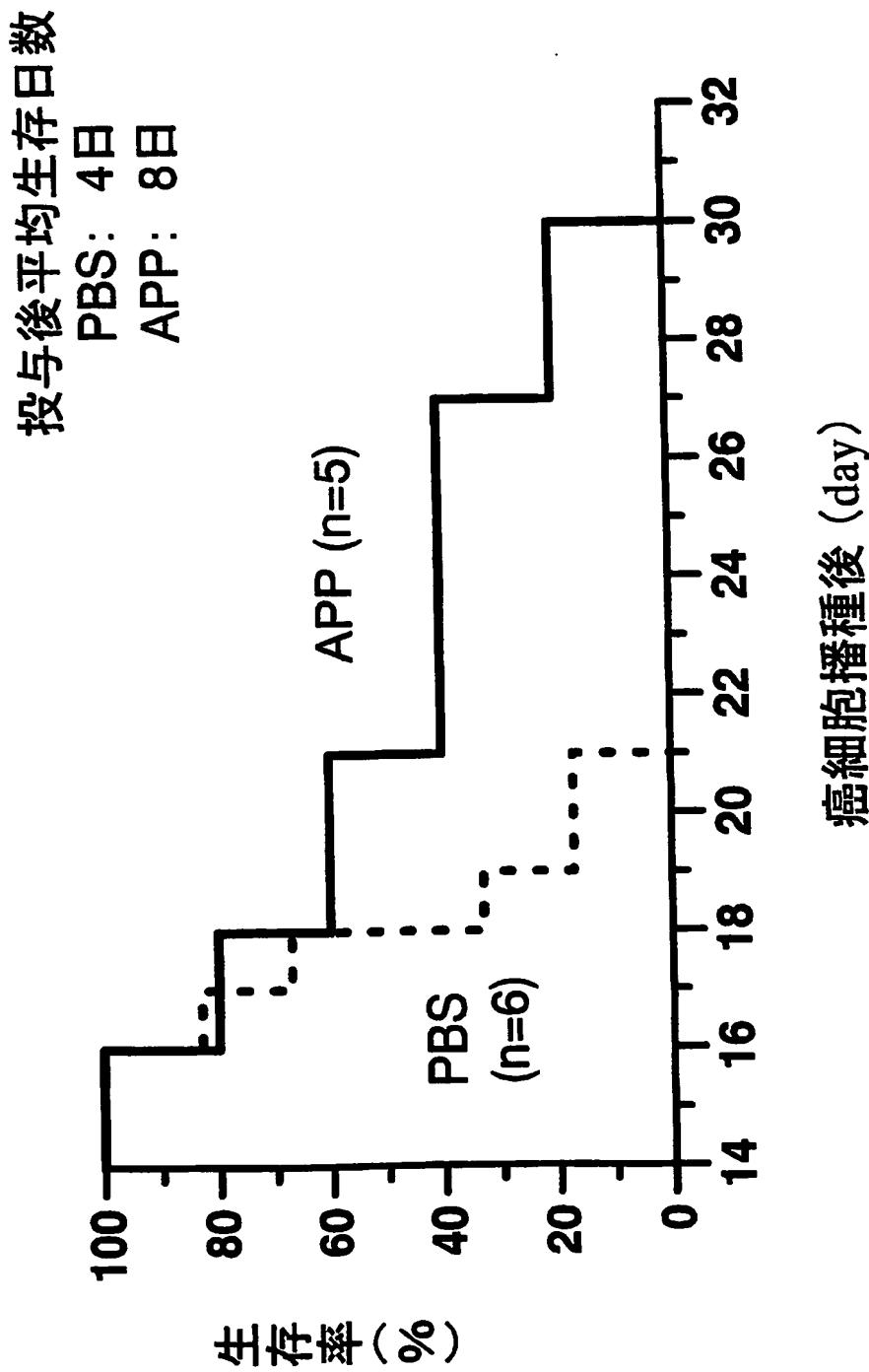
【図5】

図5



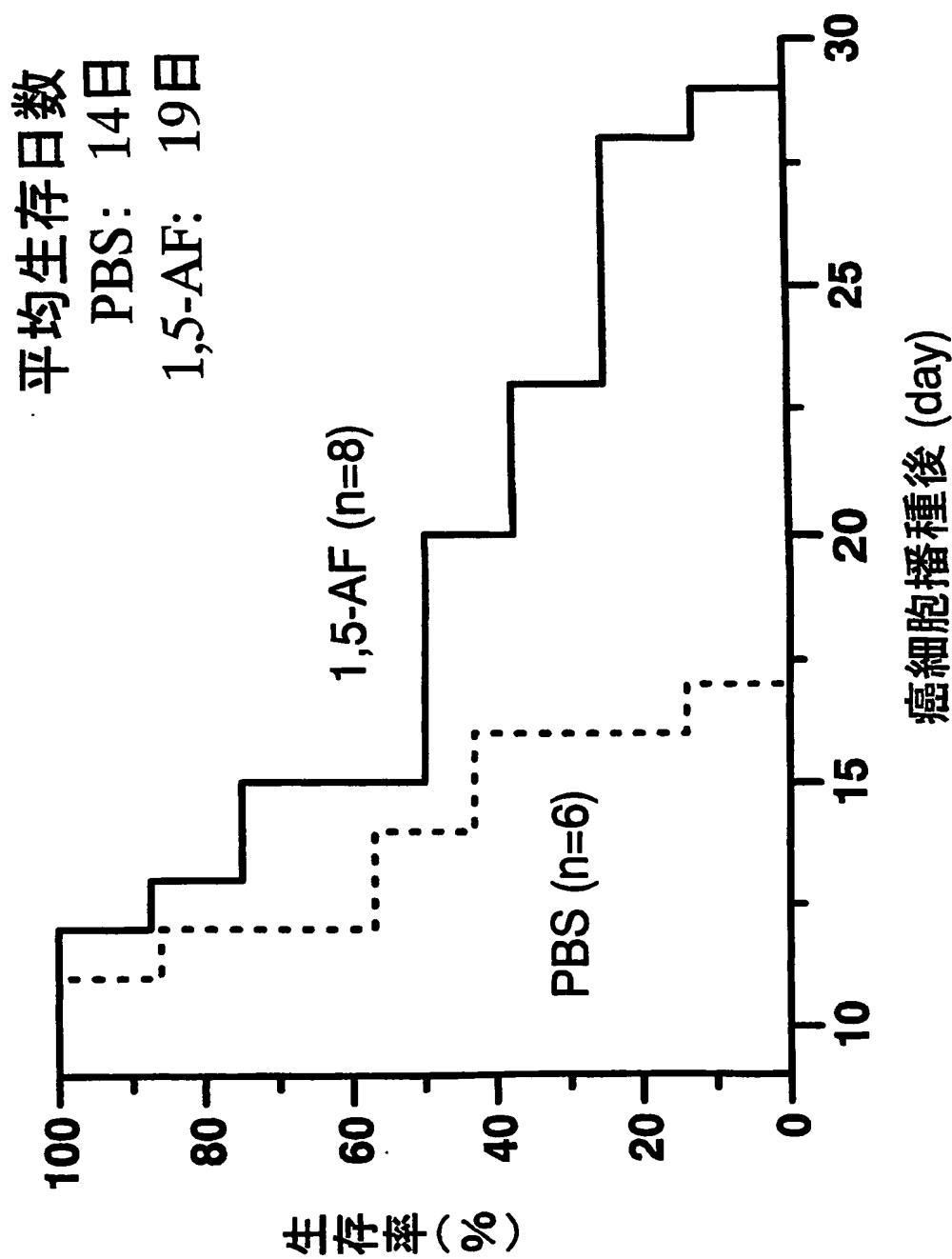
【図6】

図6



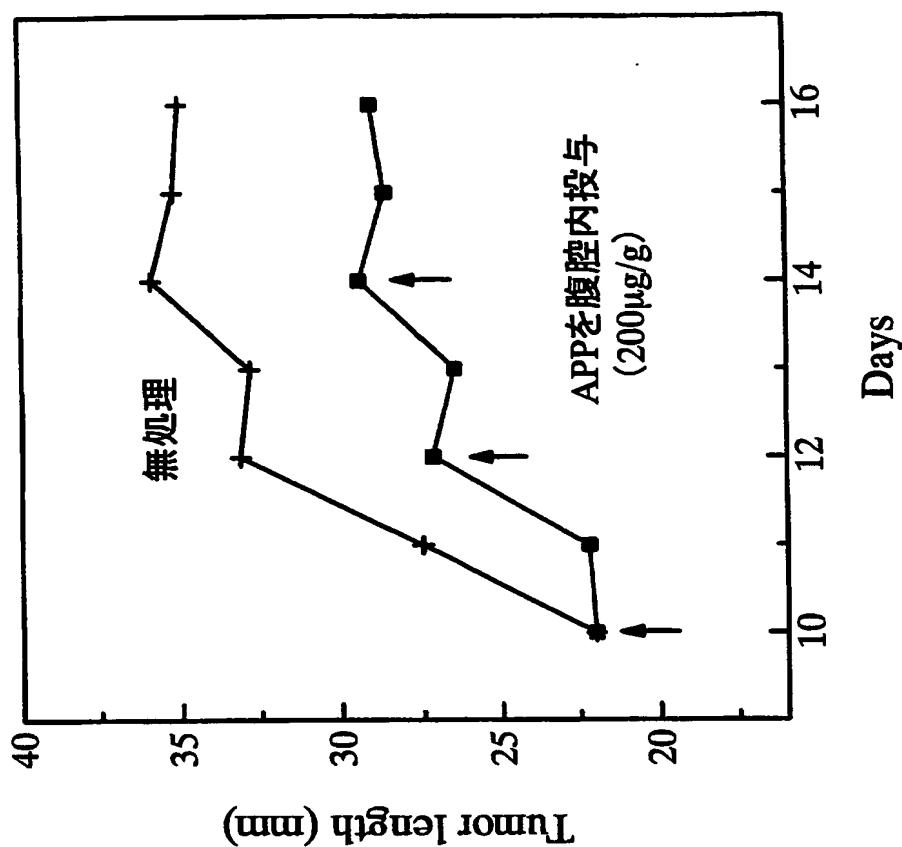
【図7】

図7



【図8】

図8



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 1, 5-D-アンヒドロフルクトースおよび/またはアスコピロンPを活性成分とする炎症を惹起しない予後に優れた腫瘍の増殖ないし転移抑制剤を提供すること。

【解決手段】 1, 5-D-アンヒドロフルクトースおよび/またはアスコピロンPを含有する腫瘍の増殖ないし転移抑制剤。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-366798
受付番号	50301782207
書類名	特許願
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成15年10月30日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	390015004
【住所又は居所】	鹿児島県鹿児島市南栄3丁目20番地
【氏名又は名称】	日本澱粉工業株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】	599074176
【住所又は居所】	鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘6-45-10
【氏名又は名称】	丸山 征郎

## 【代理人】

【識別番号】	100080609
【住所又は居所】	東京都新宿区四谷4丁目3番地 福屋ビル 大島 特許事務所
【氏名又は名称】	大島 正孝

特願 2003-366798

出願人履歴情報

識別番号 [390015004]

1. 変更年月日 1990年11月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 鹿児島県鹿児島市南栄3丁目20番地  
氏名 日本澱粉工業株式会社

特願 2003-366798

出願人履歴情報

識別番号

[599074176]

1. 変更年月日 1999年 5月31日

[変更理由] 新規登録

住所 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘6-45-10

氏名 丸山 征郎